

Method and device for optically exciting an energy state in a sample at a sample point with high positional resolution**Publication number:** DE4331570**Publication date:** 1995-03-02**Inventor:****Applicant:** HELL STEFAN (DE)**Classification:****- international:** G01N21/64; G02B21/00; G01N21/64; G02B21/00;
(IPC1-7): G02B21/00; G01N21/64; G02B21/06**- european:** G01N21/64P; G02B21/00M4A7M; G02B21/00M4A7R**Application number:** DE19934331570 19930916**Priority number(s):** DE19934331570 19930916; DE19934327643 19930817[Report a data error here](#)**Abstract of DE4331570**

The invention relates to a device for optically exciting an energy state in a sample 4 at a sample point 3 having high positional resolution, having a punctiform light source 1, an objective 2 which focusses the excitation light, which comes from the punctiform light source 1, in order to excite the energy state, onto the sample point 3 to be measured, as well as a corresponding method. The lateral resolution is improved in that the excitation is performed by interaction of at least two light components of different light properties, and the beam axes of the light components are arranged mutually offset such that the focal intensity distributions of the light components at the sample point 3 are mutually laterally shifted and overlap at their main maxima.

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide



(19) BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

(12) **Offenlegungsschrift**
(10) **DE 43 31 570 A 1**

(51) Int. Cl. 6:
G 02 B 21/00
G 02 B 21/06
G 01 N 21/64

DE 43 31 570 A 1

(21) Aktenzeichen: P 43 31 570.4
(22) Anmeldetag: 16. 9. 93
(43) Offenlegungstag: 2. 3. 95

(30) Innere Priorität: (32) (33) (31)
17.08.93 DE 43 27 643.1

(72) Erfinder:
Erfinder wird später genannt werden

(71) Anmelder:
Hell, Stefan, Dr., 67071 Ludwigshafen, DE

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

- (54) Verfahren und Vorrichtung zum optischen Anregen eines Energiezustands einer Probe in einem Probenpunkt mit hoher Ortsauflösung
- (57) Die Erfindung betrifft eine Vorrichtung zum optischen Anregen eines Energiezustandes einer Probe 4 in einem Probenpunkt 3 mit hoher Ortsauflösung, mit einer Punktlichtquelle 1, einem Objektiv 2, das das von der Punktlichtquelle 1 kommende Anregungslight zum Anregen des Energiezustandes auf den zu messenden Probenpunkt 3 fokussiert, sowie ein entsprechendes Verfahren. Die laterale Auflösung wird verbessert, indem die Anregung durch Zusammenwirken von wenigstens zwei Lichtanteilen unterschiedlicher Lichteigenschaften erfolgt und die Strahlachsen der Lichtanteile derart gegeneinander versetzt angeordnet sind, daß die fokalen Intensitätsverteilungen der Lichtanteile im Probenpunkt 3 in ihren Hauptmaxima überlappend, lateral gegeneinander verschoben sind.

DE 43 31 570 A 1

Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum optischen Anregen eines Energiezustandes einer Probe in einem Probenpunkt mit hoher Ortsauflösung, bei dem das Anregungslicht einer Punktlichtquelle auf den zu messenden Probenpunkt fokussiert wird und dort den Energiezustand anregt.

Ferner betrifft die Erfindung eine Vorrichtung zum optischen Anregen eines Energiezustandes einer Probe in einem Probenpunkt mit hoher Ortsauflösung, mit einer Punktlichtquelle, mit einem Objektiv, das von der Punktlichtquelle kommende Anregungslicht zum Anregen des Energiezustandes auf den zu messenden Probenpunkt einer im Fokalbereich des Objektives anordbaren Probe fokussiert.

Ein solches Verfahren und eine solche Vorrichtung sind aus der Praxis bekannt. Sie finden ihre Anwendung zum Beispiel bei Mikroskopen, insbesondere aber bei Rastermikroskopen, da dort einzelne Probenpunkte abgetastet und gemessen werden. Mit einem solchen Rastermikroskop kann die Probe dreidimensional vermessen werden. Verwendet werden fluoreszierende oder phosphoreszierende Proben. Ferner können ein solches Verfahren und eine solche Vorrichtung zur Definition von Punkten in optischen bzw. elektronischen Speichermedien verwendet werden.

Nachteilig an einer solchen Vorrichtung und einem solchen Verfahren gemäß dem Stand der Technik ist, daß die laterale Auflösung begrenzt ist, so daß eine feinere Unterteilung der Rasterung nicht sinnvoll ist.

Es ist bekannt, daß bei Rastermikroskopen die Auflösung dadurch verbessert werden kann, daß das von der Probe emittierte Licht punktförmig auf den Detektor abgebildet wird. Dies kommt dadurch zustande, daß in diesem Fall zwei Punktabbildungsfunktionen die Abbildung im Rastermikroskop bestimmen: die Anregungspunkt-Abbildungsfunktion, welche die Intensitätsverteilung des Anregungslichtes im Fokalbereich des Objektives angibt und aus quantenmechanischer Sicht die Wahrscheinlichkeit quantifiziert, mit der ein Beleuchtungsshoch in einem bestimmten Punkt des Fokalbereiches anzutreffen ist, und die Detektions-Abbildungsfunktion, welche die Abbildung des Probenlichtes in den Punkt detektor angibt und aus quantenmechanischer Sicht die Wahrscheinlichkeit quantifiziert, mit der ein aus dem Fokalbereich emittiertes Photon in den Punkt detektor gelangt. Da sowohl Beleuchtung und Detektion stattfinden müssen, ist die Punktabbildungsfunktion eines konfokalen Fluoreszenz-Rastermikroskopes das Produkt aus beiden Wahrscheinlichkeitsverteilungen, d. h. aus der Anregungspunkt-Abbildungsfunktion und der Detektionspunkt-Abbildungsfunktion. Die Produktbildung führt zu einem etwa 40% schmaleren Hauptmaximum der konfokalen Punktabbildungsfunktion, verglichen mit einem nicht konfokal angeordneten Mikroskop. Dies entspricht einer höheren Auflösung des konfokalen Mikroskops und bewirkt die Diskriminierung aller Punkte, die sich nicht in der unmittelbaren Umgebung des Fokus befinden. Letzteres ist Voraussetzung für die Erstellung dreidimensionaler Bilder im Rasterverfahren.

Im Hinblick auf diesen Stand der Technik liegt der Erfindung die Aufgabe zugrunde, das gattungsgemäße Verfahren und die gattungsgemäße Vorrichtung derart zu verbessern, daß eine bessere laterale Auflösung erzielt wird.

Hinsichtlich des Verfahrens wird diese Aufgabe erfin-

dungsgemäß dadurch gelöst, daß der Energiezustand der Probe in dem Probenpunkt durch Zusammenwirken von wenigstens zwei in dem Anregungslicht enthaltenen Lichtanteilen angeregt wird, die sich durch wenigstens eine Lichteigenschaft voneinander unterscheiden, und daß die Lichtstrahlachsen der Lichtanteile derart gegeneinander versetzt werden, daß die fokalen Intensitätsverteilungen der Lichtanteile im Probenpunkt in ihren Hauptmaxima überlappend, lateral gegeneinander verschoben werden.

Hinsichtlich der Vorrichtung wird die Aufgabe dadurch erfindungsgemäß gelöst, daß das Anregungslicht der Punktlichtquelle wenigstens zwei Lichtanteile umfaßt, die sich durch wenigstens eine Lichteigenschaft voneinander unterscheiden und die dazu geeignet sind, durch gemeinsames Wirken den Energiezustand der Probe anzuregen, und daß die Strahlachsen der Lichtanteile derart gegeneinander versetzt angeordnet sind, daß die fokalen Intensitätsverteilungen der Lichtanteile im Probenpunkt in ihren Hauptmaxima überlappend, lateral gegeneinander verschoben sind.

Der Begriff Lichteigenschaft ist in dieser Anmeldung im weiten Sinne zu verstehen. Es ist damit jede das Licht charakterisierende Eigenschaft gemeint, beispielsweise Wellenlänge, Polarisierung, Zeitpunkt des Verweilens eines Lichtpulses an einem bestimmten Punkt.

Zum Versetzen der Strahlachsen der Lichtanteile kann erfindungsgemäß ein Versetzungsselement vorgesehen sein. Ein solches Versetzungsselement kann variabel sein, so daß die Versetzung variiert und damit die Auflösung verbessert werden kann. Als Versetzungsselement kann ein Mikrometertisch verwendet werden.

Durch die erfindungsgemäße Anordnung der Punktlichtquelle mit wenigstens zwei Lichtanteilen, die sich durch wenigstens eine Lichteigenschaft voneinander unterscheiden und die den Energiezustand der Probe, dessen Fluoreszenz oder Phosphoreszenzübergang gemessen werden soll, durch gemeinsames Wirken anregen, wird erreicht, daß an dem zu messenden Probenpunkt die Wahrscheinlichkeit der Anregung des Energiezustandes des Probenpunktes durch das Produkt der Intensität der Lichtanteile verschiedener Lichteigenschaften gegeben ist. Die Punktabbildungsfunktion eines solchen Mikroskops ist durch das Produkt der fokalen Intensitätsverteilungen gegeben, die zu den Lichtanteilen unterschiedlicher Lichteigenschaften gehören. Durch die Produktbildung werden Probenpunkte, die sich nicht in unmittelbarer Umgebung des Fokus befinden, diskriminiert, was eine dreidimensionale Rasterung allein mit Hilfe des Anregungslichtes ermöglicht. Da die Lichtstrahlachsen der Lichtanteile mittels der Versetzungsanordnung derart gegeneinander versetzt werden, daß die fokalen Intensitätsverteilungen der Lichtanteile im Probenpunkt in ihren Hauptmaxima überlappend, lateral gegeneinander verschoben werden, ergibt sich die Anregungspunktabbildungsfunktion aus dem Produkt der lateral verschobenen Intensitätsverteilungen mit unterschiedlichen Lichteigenschaften. Durch diese Produktbildung wird das Hauptmaximum der Anregungspunktabbildungsfunktion in lateraler Richtung verschmälert und zwar entlang der Achse des Versatzes. Somit wird eine bessere laterale Auflösung erzielt.

Die Anregung des Energiezustandes der Probe durch Zusammenwirken von mindestens zwei Lichtanteilen mit unterschiedlichen Lichteigenschaften kann sowohl über einen Zwischenzustand, als auch in direkter Anregung (resonante oder nicht resonante Zweiphotonenabsorption) des Endzustandes erzielt werden. Gängige

Fluoreszenzfarbstoffe zur Markierung biologischer Proben oder auch Phosphoreszenzfarbstoffe lassen sich in diesem Zweiphotonenmodus anregen.

Bevorzugte Ausführungsbeispiele der Erfindung sind in den Unteransprüchen offenbart.

Vorteilhafterweise kann eine Lichteigenschaft, in der sich die Lichtanteile des Anregungslichtes voneinander unterscheiden, die Wellenlänge sein. Dabei ist es günstig, wenn der Unterschied in den Wellenlängen der Lichtanteile wenigstens 1 nm beträgt.

Auch kann eine Lichteigenschaft, in der sich die Lichtanteile des Anregungslichtes voneinander unterscheiden, die Polarisation sein. Die Lichtanteile sind dann vorzugsweise orthogonal oder nahezu orthogonal zueinander polarisiert. Ein Unterschied in der Polarisation der Lichtanteile führt dann zu der gewünschten Verbesserung in der lateralen Auflösung, wenn die Übergangsmatrixelemente, die die Übergänge zwischen den Energiezuständen der Probe beschreiben, polarisationsabhängig sind. Dabei können die Wellenlängen der Lichtanteile des Anregungslichtes, je nachdem, welche Probe verwendet wird, gleich oder voneinander verschieden sein.

Gemäß einer vorteilhaften Weiterbildung der Erfindung ist zwischen der Punktlichtquelle und dem Objektiv ein Filterelement angeordnet, welches einen für wenigstens den Lichtanteil des Anregungslichtes mit der einen Lichteigenschaft undurchlässigen Mittenbereich und einen für die Lichtanteile des Anregungslichtes durchlässigen Außenbereich aufweist. Hierdurch wird die laterale Auflösung nochmals erheblich verbessert. Dies kommt dadurch zustande, daß ein solches Filterelement Licht aus dem Hauptmaximum in die Beugungsnebenmaxima verlagert. Somit wird eine deutliche Verschmälerung der jeweiligen sich überlagernden Hauptmaxima erzielt, was zu einer weiteren Verschmälerung der Anregungsabbildungsfunktion führt. Die Intensitätzzunahme in den Nebenmaxima ist in diesem Fall nicht störend, da die fokalen Intensitätsverteilungen zueinander lateral versetzt sind. Somit sind die störenden Nebenmaxima gegeneinander verschoben, wodurch die Nebenmaxima unterdrückt werden, da sie sich in ihrer Wirkung nicht ergänzen. Insgesamt kann eine Verbesserung in der lateralen Auflösung um einen Faktor 2.5 erzielt werden.

Eine weitere Verschmälerung des Hauptmaximums ohne Entstehen von Nebenmaxima kann dadurch erzielt werden, daß der Mittenbereich des Filterelementes für zwei in der Lichteigenschaft verschiedene Lichtanteile des Anregungslichtes undurchlässig ist. Die oben beschriebene Wirkung des Filterelementes kann hier für zwei Lichtanteile verschiedener Lichteigenschaften ausgenutzt werden. Bei Verwendung des Filterelementes kann die laterale Verschiebung der Intensitätsverteilungen der Lichtanteile des Anregungslichtes etwa 50 bis 200 nm, ohne Verwendung eines Filterelementes etwa 100 bis 300 nm betragen.

Auch kann die Vorrichtung ein Separationselement zum Abtrennen des von der Probe abgestrahlten Emissionslichtes von dem Anregungslicht und einem Detektor zum Nachweis des Emissionslichtes aufweisen. Bei dem Emissionslicht handelt es sich um das Emissionslicht, welches aufgrund des angeregten Energiezustandes emittiert wird, der durch das Zusammenwirken der Lichtanteile angeregt wurde. In dieser Anordnung wird die Vorrichtung vorteilhafterweise als Mikroskop verwendet. Bei der Verwendung der erfindungsgemäßen Vorrichtung zur Definition von Punkten in Speicherme-

dien kann eine entsprechende Detektoranordnung zum Auslesen der Punkte verwendet werden, d. h. als Leseeinheit. Der übrige Teil der Vorrichtung, nämlich der gemäß Anspruch 9, bildet die Schreibseinheit für solche Speichermedien. Gemäß der Erfindung werden die Punkte, die die Bits darstellen, verkleinert. Dies ist selbstverständlich bereits beim Schreibvorgang mit der Vorrichtung gemäß Anspruch 9 oder dem Verfahren gemäß Anspruch 1 der Fall.

Vorteilhafterweise ist das Filterelement in der Nähe der Eintrittspupille des Objektives angeordnet. Durch diese Anordnung wird erreicht, daß eine Strahlbegrenzung vermieden wird, so daß eine gleich hohe Lichtintensität beim Bewegen des Strahls in der Fokalebene gewährleistet ist. Dieser Vorteil kann erfindungsgemäß auch dadurch erreicht werden, daß das Filterelement am Ort oder in der Nähe einer zu der Eintrittspupille des Objektives optisch konjugierten Ebene angeordnet ist.

Ferner ist es vorteilhaft, wenn der Mittenbereich des Filterelementes die Form einer Kreisscheibe hat, an welche sich der Außenbereich anschließt. Hierbei wird die Symmetrie des Abbildungslichtes am gleichförmigsten ausgenutzt. Auch ist es günstig, wenn das Filterelement derart angeordnet ist, daß die Strahlachse der Teilstrahlen des Anregungslichtes etwa durch den Mittelpunkt der Kreisscheibe verläuft und die Kreisscheibe unter einem Winkel von etwas weniger als 90° schneidet. Dabei werden störende Reflexionen an dem Filterelement in den Strahlengang vermieden.

Vorteilhafterweise kann der Mittenbereich durch eine auf das Filterelement aufgebrachte dielektrische Schicht gebildet werden. Dies macht die Filterherstellung in der Praxis besonders einfach. Das Filter kann durch Aufdampfen eines dielektrischen Materials erzeugt werden. Auch kann das Filterelement günstigerweise durch ein Farbglas optischer Güte gebildet werden. Ein solches Filterelement dient zum Herausfiltern eines Lichtanteiles einer oder mehrerer bestimmter Wellenlängen in dem Mittenbereich. Soll der Lichtanteil einer bestimmten Polarisation in dem Mittenbereich herausgefiltert werden, kann das Filterelement in dem Mittenbereich aus einem Polarisationsfilter bestehen, das den Lichtanteil mit der einen Polarisation blockiert. Sollen zwei Lichtanteile mit zwei Polarisationen aus dem Mittenbereich herausgefiltert werden, wird der Mittenbereich des Filters derart gewählt, daß er für die Wellenlängen der entsprechenden Lichtanteile undurchlässig ist, so daß der gesamte Lichtanteil blockiert wird.

Ferner kann es vorteilhaft sein, wenn das Filterelement für das von der Probe abgestrahlte Emissionslicht durchlässig ist. Dann kann die erfindungsgemäße Vorrichtung im vorteilhaften Aufbau verwendet werden, bei dem das von der Probe abgestrahlte Emissionslicht mit dem Objektiv gesammelt wird (im folgenden Rückstrahllaufbau genannt). Dabei wird verhindert, daß eine Verringerung der Intensität des Emissionslichtes aufgrund der Wirkung des Filterelements auftritt.

Gemäß einer vorteilhaften Ausführungsart der Erfindung kann die Punktlichtquelle mindestens zwei Laser umfassen, die Licht unterschiedlicher Wellenlängen als Teilstrahlen emittieren. Dabei kann die Punktlichtquelle ein Verbindungselement zum Zusammenführen des Lichtes zweier Laser aufweisen, so daß die Strahlen der beiden Laser zuverlässig auf den gleichen Probenpunkt fokussiert werden.

Als Verbindungselement der Anregungslichtstrahlen kann günstigerweise ein dichroitischer Spiegel verwen-

det werden, der das Licht des einen Lasers reflektiert und das Licht des anderen Lasers passieren läßt. Auch kann die Verwendung eines dichroitischen Würfels vorteilhaft sein.

Auch ist es vorteilhaft, wenn zwischen dem Verbindungselement und jedem Laser jeweils ein Blendenelement und ein Fokussierungselement zum Fokussieren des jeweiligen Lichtstrahles der Lichtanteile auf das entsprechende Blendenelement vorgesehen sind. Üblicherweise werden als Blendenelemente Lochblenden verwendet. Als Fokussierungselemente werden typischerweise Linsen verwendet.

Gemäß einem anderen Ausführungsbeispiel der Erfindung kann die Punktlichtquelle einen Laser umfassen, wobei hinter dem Laser ein Strahlteiler zum Aufspalten des Anregungslightstrahles in zwei Teilstrahlen und ein Verbindungselement zum Vereinigen der Teilstrahlen vorgesehen ist. Dieser Aufbau ist dann günstig, wenn der Laser Licht verschiedener Wellenlängen gleichzeitig emittiert. Dann können die beiden Lichtanteile unterschiedlicher Wellenlängen gegeneinander versetzt werden. Auch ist dieser Aufbau ist dann vorteilhaft, wenn die beiden Lichtanteile eine gleiche Wellenlänge, aber unterschiedliche Polarisation aufweisen. Günstigerweise sind polarisationsoptische Elemente vorgesehenen, die die Teilstrahlen zueinander in ihrer Polarisation orthogonalisieren. Dies kann zum einen dadurch verwirklicht werden, daß in jedem Teilstrahl ein Polarisator vorgesehen ist. Zum anderen kann zwischen dem Laser und dem Strahlteiler ein Polarisator vorgesehen sein oder ein Laser verwendet werden, der polarisiertes Licht emittiert und in einem der Teilstrahlen ein L/2-Plättchen angeordnet sein.

Auch ist es vorteilhaft, wenn wenigstens ein gepulster Laser verwendet wird. Hierdurch wird eine besonders hohe Intensität in den Probenpunkten erzielt. Es ist darauf zu achten, daß die beiden Teilstrahlen keine Laufzeitunterschiede aufweisen. Wird nur ein Laser verwendet, wobei der Laserstrahl in zwei Teilstrahlen aufgespalten wird, so wird bei der Verwendung eines gepulsten Lasers der Puls in zwei Teipulse aufgespalten. Wenn die Strahlen wieder vereinigt werden, muß darauf geachtet werden, daß sich auch die jeweiligen Pulse nach Durchlaufen der Teilstrahlen, die jetzt eine unterschiedliche Polarisation aufweisen, überlappen. Hierzu werden die Teilwege, die die Lichtanteile zurücklegen, vermessen, und es wird ein feines Translationselement eingefügt, mit dem die Länge eines der von den Lichtanteilen zurückzulegenden Wege verändert kann. Ein solches Translationselement ist beispielsweise ein Umlenkspiegel, der mit einem Piezoelement verschoben wird. Werden zwei gepulste Laser mit unterschiedlicher Wellenlänge verwendet, so treten die gleichen Probleme auf. Hier müssen die beiden Laser zusätzlich mit der gleichen Frequenz pulsieren. Die letztere Schwierigkeit kann dadurch vermieden werden, daß ein gepulster Laser und ein kontinuierlich arbeitender Laser in der Lichtquelle 1 verwendet wird.

Ferner ist es vorteilhaft, wenn das Separationselement ein dichroitischer Spiegel ist. Dann kann die Anordnung in dem platzsparenden Rückstrahlaufbau verwendet werden. Es kann auch vorteilhaft sein, wenn das Separationselement mindestens ein Filter umfaßt; dies ist für einen einfachen Transmissionsaufbau der Vorrichtung günstig. Ferner kann das Separationselement eine Kombination von Farbfiltern und dielektrischen Filtern enthalten. Auch kann das Separationselement Glimmerplättchen aufweisen.

Auch kann der Detektor in kurzer Entfernung hinter der Probe angeordnet sein. Das ist dann besonders vorteilhaft, wenn das nachzuweisende Fluoreszenzlicht im UV-Bereich liegt, da in diesem Fall eine Strahlfokussierung sehr schwierig ist. Die Entfernung ist so bestimmt, daß wenigstens ein Separationselement, jedoch kein abbildendes optisches Element zwischen der Probe und dem Detektor angeordnet werden kann.

Ebenfalls kann es günstig sein, wenn der Detektor ein Punktdetektor ist. Dann kann vorteilhafterweise vor dem Detektor ein Fokussierungselement, z. B. eine weitere Linse oder ein weiteres Objektiv, angeordnet sein, welches das Emissionslicht auf eine dem Detektor vorgeschaltete Detektorblende, für welche beispielsweise eine Lochblende verwendet wird, in den Detektor fokussiert. Der Durchmesser der Blende ist vorzugsweise so groß, daß deren Bild im Probenbereich in der Größenordnung des Airyscheibchens ist, das man bei der Wellenlänge des zu detektierenden Lichtes hat. In diesem Fall ergibt sich die im Detektor registrierte Intensität aus dem Produkt der Intensitätsverteilungen der Anteile des Beleuchtungslichtes unterschiedlicher Wellenlängen, die gemeinsam zum Anregen des Energiezustandes beitragen, und der Detektorpunkt-Abbildungsfunktion für das zu detektierende Emissionslicht. Somit wird eine zusätzliche Verschärfung des Hauptmaximums und damit eine weitere Verbesserung der lateralen Auflösung erzielt. Zusätzlich werden Nebenmaxima, die aufgrund der Strahlversetzung in der zu der lateralen Richtung orthogonalen Richtung reduziert.

Günstigerweise kann zwischen der Punktlichtquelle und der Probe eine Strahlrastereinrichtung (Strahlscanngeneinrichtung) zum gesteuerten Abrastern der Probe mit dem Anregungslight vorgesehen sein. Die Strahlrastereinrichtung bewirkt, daß der Anregungslightstrahl eine Richtungsänderung erfährt, die so erfolgt, daß der Drehpunkt in der Eintrittspupille eines auf die Probe gerichteten Objektives ruht, und der fokussierte Anregungslightstrahl im Probenbereich eine Bewegung in der Fokalebene durchführt. In einer bevorzugten Ausführung umfaßt die Strahlrastereinheit darüberhinaus auch eine mechanische Translationseinheit, welche am beleuchtenden Objektiv angebracht ist und zur axialen Bewegung desselben dient. Damit ist ein Abrastern der gesamten Probe möglich. Die erfindungsgemäßen Vorteile können in einem typischen Rastermikroskop ausgenutzt werden. Im Rückstrahlaufbau befindet sich die Strahlrastereinrichtung günstigerweise zwischen dem Separationselement und dem Filterelement.

Erfindungsgemäß kann die Probe auf einem Positioniertisch angeordnet sein, der eine mechanische Rasterbewegung zumindest in Richtung der optischen Achse durchführt. Auch kann das Objektiv derart angeordnet sein, daß es eine Bewegung in Richtung der optischen Achse durchführt.

Gemäß einem weiteren erfindungsgemäßen Ausführungsbeispiel kann die Punktlichtquelle derart ausgebildet sein, daß sie gepulstes Anregungslight emittiert, wobei einer der Lichtanteile, der erste, dazu geeignet ist, einen Zwischenenergiezustand der Probe anzuregen, ein anderer, der zweite, der Lichtanteile dazu geeignet ist, von dem Zwischenenergiezustand aus, den Energiezustand der Probe anzuregen und wobei die Lichteigenschaft, in der sich die Lichtanteile unterscheiden, der Zeitpunkt des Verweilens des jeweiligen Lichtpulses an dem Probenpunkt ist. Bei diesem Ausführungsbeispiel wird die Verbesserung der lateralen Auflösung in dem Probenpunkt dadurch erzielt, daß an dem Probenpunkt

die Wahrscheinlichkeit der Anregung des Energiezustandes der Probe durch das Produkt der Intensität des ersten Lichtanteiles, der den Zwischenenergiezustand zu einem bestimmten ersten Zeitpunkt anregt und der Intensität des zweiten Lichtanteiles, der von dem Zwischenenergiezustand aus den Energiezustand der Probe zu einem etwas späteren zweiten Zeitpunkt anregt, gegeben ist. Durch die Verwendung von gepulstem Anregungslicht wird erreicht, daß die erforderliche Zweiphotonenanregung des Energiezustandes der Probe nicht durch Photonen eines der Lichtanteile alleine, sondern durch Zusammenwirken des ersten und des zweiten Lichtanteiles erfolgt. Dies ist insbesondere dann von Interesse, wenn die Anordnung von dem Energiezustand und dem Zwischenenergiezustand derart ist, daß deren Anregung mit Licht der gleichen Wellenlängen erfolgen kann. Es ist selbstverständlich, daß dieses Ausführungsbeispiel auch in Kombination mit allen oben bereits erwähnten vorteilhaften Weiterbildungen der Erfindung verwendet und ausgestattet werden kann. Auch hier ist wesentlich, daß die Detektion des Emissionslichtes derart erfolgt, daß das Emissionslicht des Energiezustandes gemessen wird, welcher durch Zusammenwirken der beiden Lichtanteile angeregt wurde.

Vorteilhaftweise umfaßt die Lichtquelle einen gepulsten Laser, einen ersten Strahlteiler zum Aufspalten des von dem Laser kommenden Anregungslichts in den ersten und in den zweiten Lichtanteil, und einen zweiten Strahlteiler zum Vereinigen der beiden Lichtanteile, wobei in dem Strahlengang des zweiten Lichtanteiles eine Verzögerungsvorrichtung zum Verzögern der Pulse des zweiten Lichtanteiles, der zweiten Lichtpulse, vorgesehen ist. Dies ist eine besonders einfache und wirtschaftlich rentable Vorrichtung, da nur ein Laser verwendet werden muß. Die Verzögerungseinrichtung kann dabei zwei Spiegel umfassen. Die Spiegel können gleichzeitig als das Versetzungsselement zum Versetzen der Strahlachsen der Lichtanteile in lateraler Richtung dienen. Dies ist insbesondere dann günstig, wenn die Verzögerung größer als 0,1 mm ist, da in diesem Fall diese Anordnung ohne großen technischen Aufwand verwendet werden kann und sehr einfach ist.

Ferner ist es vorteilhaft, wenn die Verzögerungseinrichtung derart ausgebildet ist, daß die Zeitverzögerung zwischen dem Lichtpuls des ersten Lichtanteiles, dem ersten Lichtpuls, und dem zweiten Lichtpuls weniger als 1 ns, vorzugsweise etwa 0,1 ns, beziehungsweise etwa 30 mm im optischen Wegunterschied beträgt. Die Lichtquelle emittiert günstigerweise kurze Pulse, vorzugsweise Pulse von 0,1 ns und kürzer. Hierzu kann ein Femto- oder ein Pikosekunden-Laser verwendet werden, z. B. ein Titan-Saphir-Laser oder ein Farbstofflaser. Die Pulse derartiger Laser können im Femtosekundenbereich liegen, so daß die erforderliche gewünschte kurze Pulslänge erzielt werden kann. Derartige Laser sind kommerziell erhältlich. Als Probe kann beispielsweise der Farbstoff Rhodamin B verwendet werden. Durch die gewählte zeitliche Verzögerung zwischen dem ersten Puls und dem zweiten Puls und der Pulslänge wird erreicht, daß der erste, der früher ankommende Puls, den Zwischenenergiezustand anregt und dann die Probe wieder verläßt. Innerhalb der Lebensdauer des Zwischenenergiezustandes erfolgt die zweite Anregung in den Energiezustand aufgrund des zweiten Lichtpulses. Bei den gewählten Bedingungen ist der Zwischenenergiezustand noch nahezu voll besetzt und der erste Puls hat die Probe bereits so weit verlassen, daß die Anregung in den Energiezustand nur aufgrund des zweiten

Pulses erfolgt. Somit ist gewährleistet, daß die Gesamtanregung des Energiezustandes der Probe durch das Zusammenwirken des ersten und des zweiten Pulses, die zudem auch lateral versetzt sind, erfolgt.

Dadurch daß die Pulse zeitlich steil sind, wird erreicht, daß die Pulse deutlich kürzer sind, im obigen Beispiel etwa einem Zehntel der Lebensdauer des Zwischenenergiezustandes entsprechen. Somit ist gewährleistet, daß der erste Puls die Probe zu dem Zeitpunkt verlassen hat, zu dem der zweite Puls in dem Probenpunkt verweilt.

Auch können in dem Lichtweg des jeweiligen Lichtanteiles Elemente zur Intensitätsregulierung des Lichtanteiles vorgesehen sein. Hierzu können beispielsweise Graufilter verwendet werden. Bei der Verwendung des Farbstoffes Rhodamin B ist es günstig, wenn die Intensität des zweiten Lichtpulses etwa 10mal stärker ist als die Intensität des ersten Lichtpulses. Dies führt daher, daß die Übergangswahrscheinlichkeit von dem Zwischenenergiezustand in den Energiezustand etwa 10mal niedriger ist als der Übergang von dem Grundzustand in den Zwischenenergiezustand, der aufgrund des ersten Pulses angeregt werden soll. Bei anderen Proben wird entsprechend der Übergangswahrscheinlichkeiten des durch den ersten Lichtpuls und den zweiten Lichtpuls anzuregenden Zwischenenergiezustands und Energiezustands die Intensitätsregulierung entsprechend gewählt.

Auch kann hinter dem Laser eine nicht lineare optische Einheit zur Veränderung der Lichtwellenlänge, z. B. eine Frequenzverdopplungseinheit, wie ein Frequenzverdopplungskristall, vorgesehen sein. Dies ermöglicht insbesondere bei der Verwendung eines Titan-Saphir-Lasers einen einfachen Aufbau. Dies führt zu einer typischen Pulsdauer von 100fsec und einer typischen Wellenlänge von 350—500 nm.

Im folgenden ist die Erfindung anhand der Zeichnung näher beschrieben. Es zeigt

Fig. 1 eine schematische Darstellung eines Ausführungsbeispiels der erfindungsgemäßen Vorrichtung,

Fig. 2 die lateral verschobenen Intensitätsverteilungen zweier Lichtanteile mit verschiedener Lichteigenschaft des Anregungslichtes am Probenpunkt,

Fig. 3 die Anregungspunkt-Abbildungsfunktion des Anregungslichtes am Probenpunkt gemäß der Erfindung (Produkt der Intensitätsverteilungen der Lichtanteile aus Fig. 2), und

Fig. 4 eine schematische Darstellung eines weiteren Ausführungsbeispiels der erfindungsgemäßen Vorrichtung.

Fig. 1 zeigt ein Ausführungsbeispiel der erfindungsgemäßen Vorrichtung. Das Ausführungsbeispiel bezieht sich auf ein Rastermikroskop. Durch dieses Ausführungsbeispiel soll die Verwendung der erfindungsgemäßen Vorrichtung und des erfindungsgemäßen Verfahrens als normales Mikroskop und insbesondere die Anwendung zur Definition von Punkten in Speichermedien, die Bits darstellen, nicht ausgeschlossen werden. Das Licht einer Punktlichtquelle 1 wird mittels eines Objektives 2 auf einem Probenpunkt 3 einer Probe 4 abgebildet. In dem hier gezeigten Rückstrahlrausbau wird das von der Probe 4 emittierte Emissionslicht, das durch das Anregungslicht erzeugte Fluoreszenz- oder Phosphoreszenzlicht, über ein Separationselement 5 auf einen Detektor 6 abgebildet. Als Separationselement 5 wird typischerweise ein dichroitischer Spiegel verwendet. Die Lichtquelle 1 umfaßt zwei Laser 7 und 8, von welchen der Laser 7 Licht der Wellenlänge L_1 und/oder

Licht der Polarisation P_1 und der Laser 8 Licht der Wellenlänge L_2 und/oder Licht der Polarisation P_2 emittiert. Dabei ist L_1 ungleich L_2 und/oder P_1 ungleich P_2 . Ungleiche in der Polarisation bedeutet, daß die Polarisationen P_1, P_2 der Lichtanteile orthogonal oder nahezu orthogonal zueinander sind. Das Licht der beiden Laser 7 und 8 wird mittels eines Verbindungselementes 9 , beispielsweise eines dichroitischen Spiegels, zusammengeführt und über das Separationselement 5 auf den Probenpunkt 3 der Probe 4 gelenkt. Zwischen dem Verbindungselement 9 und jedem Laser $7, 8$ ist jeweils ein Blendenelement $10, 11$ und eine Fokussierungselement $12, 13$ zum Fokussieren des jeweiligen Lichtstrahles der Lichtanteile auf das entsprechende Blendenelement vorgesehen. Als Fokussierungselemente $12, 13$ werden typischerweise Linsen, als Blendenelemente $10, 11$ Lochblenden verwendet. Durch diese Anordnung wirken die Laser 7 und 8 als Punktlichtquellen. Der Ausgang der Punktlichtquelle 1 wird durch Vereinigung der beiden Laserstrahlen auf dem Verbindungselement 9 erreicht.

Die Strahlachsen der Lichtanteile L_1, L_2 sind gegenüber der in der Figur dargestellten Symmetriearchsen, gemäß denen die Hauptmaxima der Intensitätsverteilungen der Lichtanteile zusammenfallen würden, versetzt angeordnet und zwar so, daß die fokalen Intensitätsverteilungen der Lichtanteile im Probenpunkt 3 in ihren Hauptmaxima überlappen, lateral gegeneinander verschoben sind. Gemäß der Fig. 1 sind die Strahlen der Lichtanteile dadurch versetzt, daß die Laser seitlich der optischen Achse angeordnet sind. Es kann aber auch ein Versetzungsselement vorgesehen sein, mit dem die Versetzung variiert werden kann. Hierzu kann z. B. ein Mikrometertisch verwendet werden. Durch die Änderung der Versetzung kann jeweils die optimale Auflösungsverbesserung erzielt werden.

Fig. 2 zeigt die Intensitätsverteilung der von den Lasern $7, 8$ auf den Probenpunkt 3 fokussierten Lichtanteile mit unterschiedlicher Wellenlänge L_1, L_2 oder mit unterschiedlicher Polarisation P_1, P_2 , die lateral in ihren Hauptmaxima überlappend gegeneinander verschoben sind. Die Anregungspunktabbildungsfunktion in der Fokalebene der erfindungsgemäßen Anordnung ist in Fig. 3 gezeigt. Die Anregungspunktabbildungsfunktion ergibt sich aus dem Produkt der in Fig. 2 dargestellten, gegeneinander versetzten Intensitätsverteilungen mit unterschiedlichen Wellenlängen L_1, L_2 oder unterschiedlichen Polarisationen P_1, P_2 . Bei der Überlagerung der beiden Intensitätsverteilungen entsteht in der Gesamtfunktion der Fig. 3 ein schmales Hauptmaximum und somit eine bessere laterale Auflösung der Vorrichtung. Der Energiezustand der Probe 4 in dem Probenpunkt 3 wird durch Zusammenwirken von Photonen der beiden Lichtanteile, deren Intensitätsverteilungen in ihren Hauptmaxima überlappend lateral gegeneinander verschoben sind und die unterschiedliche Wellenlängen L_1, L_2 oder unterschiedliche Polarisationen P_1, P_2 aufweisen, angeregt. Durch das Zusammenwirken der Photonen der verschiedenen Lichtanteile erfolgt die Anregung in dem Energiezustand der Probe 4 gemäß der Anregungspunktabbildungsfunktion entsprechend Fig. 3. Der effektive Fokus eines Rastermikroskopes ist in der Fokalebene schmal, so daß durch Detektion des Emissionslichtes der Probe 4 im Detektor 6 eine höher auflösende Abbildung der Probe 4 erzielt wird.

Um eine weitere Verbesserung in der lateralen Auflösung zu erzielen, durchläuft das aus der Punktlichtquelle 1 austretende Laserlicht, nachdem es durch das Separationselement 5 umgelenkt wird, und bevor es von dem Objektiv 2 auf den Probenpunkt 3 abgebildet wird, ein Filterelement 14 . Das Filterelement 14 weist einen Mittbereich 15 auf, der für die Lichtanteile einer oder beider Wellenlängen L_1, L_2 oder einer oder beider Polarisationen P_1, P_2 durchlässig ist. Ferner weist das Filterelement 14 einen Außenbereich 16 auf, der für die beiden Lichtanteile durchlässig ist. Das Filterelement 14 ist in der Nähe der Eintrittspupille des Objektives 2 angeordnet. Als Filterelement 14 wird ein Filter verwendet, auf das der Mittbereich 15 durch Aufdampfen einer dielektrischen Schicht erzeugt wird oder ein Farbglas optischer Güte ist, oder dessen Mittbereich 15 ein Polarisationsfilter aufweist, das den Lichtanteil mit der einen Polarisation P_1 blockiert. Ferner ist der Mittbereich 15 und der Außenbereich 16 des Filterelements 14 für das von der Probe 4 abgestrahlte Emissionslicht durchlässig. Die Lichtstrahlachse verläuft durch den Kreismittelpunkt und das Filterelement 14 weist hinsichtlich der Strahlachse einen Neigungswinkel von ein paar Grad auf, um störende Reflexionen zu vermeiden. Vor dem Detektor 6 ist ein Filter 17 zum Abblocken des restlichen Anregungslichtes vorgesehen.

Ferner ist zwischen dem Separationselement 5 und dem Filterelement 14 eine Strahlrastereinrichtung 18 vorgesehen, mit der die Probenpunkte 3 der Probe 4 abgerastert werden können. Zwischen dem Separationselement 5 und der Strahlrastereinrichtung 18 ist eine weitere Linse 19 angeordnet, durch deren Wirkung der von der Punktlichtquelle 1 und dem Separationselement 5 kommende Lichtstrahl parallelisiert wird. Dabei entspricht die Summe des Abstandes der Linse 19 zu dem Separationselement 5 und des Abstandes des Separationselementes 5 zu den Lochblenden $10, 11$ der Brennweite der Linse 19 .

Zur weiteren Verbesserung der Auflösung ist vor dem Detektor 6 eine in der Figur nicht dargestellte Blende im Abstand der Brennweite der Linse 19 angeordnet. Üblicherweise wird als Detektorblende eine Lochblende verwendet, oder die Öffnung des Detektors dient als Blende, wobei der Durchmesser der Blende so groß ist, daß ihr Bild im Probenbereich in der Größenordnung des ersten Hauptmaximums der Punktabbildungsfunktion des Fokussierungselementes zur Fokussierung des Emissionslichtes ist. Als Detektor 6 wird ein Fotomultiplier oder ein Halbleiterdetektor verwendet. Aufgrund der Punktabbildung des Probenpunktes 3 auf den Detektor 6 wird der Intensitätsverteilung aus Fig. 3 eine Detektionspunktabbildungsfunktion überlagert, welche zu einer weiteren Verschmälerung des Hauptmaximums führt. Zudem werden Nebenmaxima, die aufgrund der Strahlversetzung in der zu der lateralen Richtung orthogonalen Richtung in der Anregungspunktabbildungsfunktion entstanden sind, reduziert.

Es sei darauf hingewiesen, daß das in der Fig. 1 dargestellte Ausführungsbeispiel, nämlich ein Rastermikroskop mit erheblicher Verbesserung in der lateralen Auflösung, keine Einschränkung der erfindungsgemäßen Vorrichtung ist. Beispielsweise ist es möglich, anstelle der beiden Laser 7 und 8 nur einen Laser 7 zu verwenden, wobei hinter dem Laser 7 ein Strahleiter zum Aufspalten des Anregungslichtes in zwei Teilstrahlen vorgesehen sind, die wieder mittels des Verbindungselementes 9 vereinigt werden. Soll die Anregung des Energiezustandes in diesem Fall mit Lichtanteilen unterschiedlicher Polarisation erfolgen, so sind polarisationsoptische Elemente vorgesehen, die die Teilstrahlen zueinander in ihrer Polarisation orthogonalisieren. Dies

kann dadurch realisiert werden, daß in den beiden Teilstrahlen jeweils ein Polarisator vorgesehen ist, wobei die Polarisatoren zueinander orthogonale oder nahezu orthogonale Polarisationsebenen aufweisen. Ferner kann dies dadurch realisiert werden, daß zwischen dem Laser 7 und dem Strahlteiler ein Polarisator vorgesehen ist, oder statt dessen ein Laser 7 verwendet wird, der polarisiertes Licht emittiert, und daß in dem Strahlengang eines der Teilstrahlen ein L_{1/2} Plättchen vorgesehen ist.

Ferner kann statt dem Rückstrahllaufbau eine Transmissionsanordnung verwendet werden, bei welcher das Separationselement 5 durch ein Filter realisiert wird, welches hinter der Probe 4 angeordnet ist, wobei der Detektor 6 hinter dem Filter anzubringen ist. Im letzteren Fall kann der Detektor 6 direkt hinter der Probe angeordnet werden. Dies ist dann vorteilhaft, wenn das Fluoreszenzlicht der Probe 4 im UV-Bereich liegt, da dann eine Strahlfokussierung schwierig ist. Bei der Transmissionsvorrichtung ist es zudem nicht erforderlich, daß das Filterelement 14 für das Emissionslicht der Probe 4 durchlässig ist.

Auch kann die Vorrichtung Glasfaser umfassen. Wenn zwei Laser verwendet werden, sind die Fasern derart angeordnet, daß das Licht eines jeden Lasers jeweils in eine Faser eingekoppelt wird. Dabei wirken die Faserenden als Lochblenden 10, 11. Die Faserenden können lateral versetzt angeordnet werden. Dabei können die Fasern sehr einfach mit Hilfe von Mikrometertischen verschoben werden. Bei Verwendung eines Lasers wird jeweils ein Lichtanteil in eine Faser eingekoppelt, wobei die Faserausgänge ebenfalls als Lochblenden wirken. Die Lichtanteile unterschiedlicher Lichteigenschaften können vor dem Einkoppen mittels eines dichroitischen Spiegels (bei unterschiedlichen Wellenlängen) oder mittels eines Polarisationsstrahlteilerwürfels (bei unterschiedlicher Polarisation) aus dem Strahl getrennt werden.

Die Probe 4 ist auf einem Scantisch 21 befestigt, der vorzugsweise eine Mikroskoppositionierung der Probe 4 in axialer Richtung und damit ein axiales Rastern erlaubt. Aufbau und Justierung des Rastermikroskopes erfolgt, soweit nicht explizit beschrieben, auf dem Fachmann bekannte Art und Weise.

Fig. 4 zeigt eine schematische Darstellung einer Anordnung gemäß einem anderen erfindungsgemäßen Ausführungsbeispiel. Sich entsprechende Elemente sind mit gleichen Bezugszeichen bezeichnet, wie in den vorhergehenden Ausführungsbeispielen. Selbstverständlich ist die Erfindung nicht auf die im folgenden gezeigte Anordnung eingeschränkt, sondern es sind auch alle oben beschriebenen Variationen mit diesem Ausführungsbeispiel kombinierbar.

Es wird im folgenden insbesondere auf die Komponenten eingegangen, die sich von den vorherigen Ausführungsbeispielen unterscheiden. Das Licht des gepulsten Lasers 7, welcher ein Titan-Saphir-Laser sein kann, wird von einem Frequenzverdopplungselement 22 in seiner Frequenz verdoppelt und von einem ersten Strahlteiler 23 in zwei Lichtanteile aufgespalten. Der erste Lichtanteil durchläuft den direkten Teilweg bis zu einem zweiten Strahlteiler 24, wohingegen der zweite Lichtanteil über einen längeren Weg über eine Verzögerungsanordnung 25, 26 durchläuft und dann hinsichtlich des ersten Teilstrahles zu einem späteren Zeitpunkt und lateral versetzt auf den zweiten Strahlteiler 24 trifft. Für Verzögerungen in der Größenordnung von 0,1 nsec können für die Verzögerungsanordnung, wie in Fig. 4

dargestellt, Spiegel 25, 26 verwendet werden. Die Lichtanteile a und b fallen zu entsprechend zueinander verzögerten Zeitpunkten und mit einer lateralen Versetzung auf des Separationselement 5, von welchem sie mittels des Objektives 2 auf den Probenpunkt 3 der Probe 4 fokussiert werden. Dort regt der zuerst an kommende Puls des Lichtanteiles a den Zwischenenergiezustand der Probe 4 an. Innerhalb der Lebensdauer des Zwischenenergiezustandes und wenn der erste Puls des ersten Lichtanteiles die Probe 4 bereits verlassen hat, erfolgt die Anregung des Zwischenenergiezustandes in den Energiezustand der Probe 4 mittels des zweiten, zu dem ersten verzögerten und lateral versetzten Puls b. Das Emissionslicht der Probe 4, das von dem durch das Zusammenwirken des ersten und des zweiten Lichtpulses aus dem ersten und dem zweiten Lichtanteil angeregten Energiezustand der Probe emittiert wird, wird in dem Detektor 6 nachgewiesen. In den Teilwegen der Lichtanteile sind Elemente zur Intensitätsregulierung der Lichtpulse in den Teilstrahlen, beispielsweise Graufilter 27, 28, vorgesehen. Das Absorptionsvermögen dieser Elemente ist derart gewählt, daß unterschiedliche Übergangswahrscheinlichkeiten von dem Übergang von dem Grundzustand zu dem Zwischenenergiezustand und von dem Zwischenenergiezustand in den Energiezustand der Probe kompensiert werden können. Bei der Verwendung des Farbstoffes Rhodamin B beispielsweise ist die Übergangswahrscheinlichkeit von dem Zwischenenergiezustand in den Endenergiezustand 10mal niedriger als die Übergangswahrscheinlichkeit von dem Grundzustand in den Zwischenenergiezustand der Probe. Daher werden in diesem Fall die Elemente zur Regulierung der Intensität der Teilpulse derart gewählt, daß der Lichtpuls des Lichtanteiles b 10mal stärker ist als die Intensität des Lichtpulses des Lichtanteiles a.

Im übrigen kann eine weitere Verbesserung der lateralen Auflösung von Vorrichtung und Verfahren gemäß der Erfindung dadurch erreicht werden, daß mindestens einem Teilstrahl ein Koma zugefügt wird. Dadurch wird die Intensitätsverteilung des Teilstrahls am Probenpunkt auf einer Seite steiler, auf der gegenüberliegenden Seite flacher. Das Koma wird derart dem Teilstrahl zugefügt, daß der steilere Teil der Intensitätsverteilung im Überlappungsbereich der Hauptmaxima der Lichtanteile liegt. Das Koma kann auch beiden Teilstrahlen zugefügt werden. Das Koma kann etwa durch Einführen eines Keiles, z. B. aus Glas, in den jeweiligen Teilstrahl realisiert werden.

Im folgenden wird die Verwendung der erfindungsgemäßen Vorrichtung anhand des ersten Ausführungsbeispiels des erfindungsgemäßen Verfahrens beschrieben. Die Probe 4 und die Laser 7 und 8 werden so ausgewählt, daß Photonen aus beiden Lasern 7 und 8 und damit Photonen unterschiedlicher Wellenlänge und/oder Polarisation, zusammenwirken, um einen Zustand der Probe 4 energetisch anregen zu können. Bei Verwendung zweier Wellenlängen ist die Summe der Energien von einem Photon aus dem einen Laser 7 und einem Photon aus dem anderen Laser 8 gleich der Anregungsenergie und in etwa gleich der Differenz zwischen dem Energiezustand vor der Anregung und im angeregten Zustand der Probe. Die Lichtstrahlachsen der Lichtanteile, die durch die Laser 7, 8, die Fokussierungselemente 12, 13 und die Blendedelemente 10, 11 gebildet werden, werden derart gegeneinander versetzt, daß die fokalen Intensitätsverteilungen der Lichtanteile im Probenpunkt in ihren Hauptmaxima überlappend, lateral

gegeneinander verschoben werden. Die Probe 4 wird im Fokalbereich des Objektives 2 der erfundungsgemäßen Vorrichtung positioniert. Zwischen der Strahlrastereinrichtung 18 und dem Objektiv 2 wird das Filterelement 14 angeordnet. Der Strahlengang wird so ausgerichtet, daß das von der Lichtquelle 1 und somit von dem Verbindungselement 9 kommende Anregungslicht von dem Separationselement 5 umgelenkt wird, von der Linse 19 in die Strahlrastereinrichtung 18 abgebildet wird, danach das Filterelement 14 durchläuft und von dem Objektiv 2 auf den Probenpunkt 3 abgebildet wird. Das infolge der Anregung emittierte Fluoreszenz- oder Phosphoreszenzlicht der Probe 4 in dem Probenpunkt 3 durchläuft die Anordnung rückwärts bis zu dem Separationselement 5, von welchem es durch das Filter 17 in den Detektor 6 geleitet wird. Dabei wird der Probenpunkt 3 mit einer sehr hohen lateralen Auflösung gemessen. Mittels der Strahlrastereinrichtung 18 wird der Anregungslichtstrahl automatisch zu einem weiteren Probenpunkt 3' gelenkt, dessen Emissionslicht ebenfalls in dem Detektor 6 gemessen wird. Entsprechend werden durch Steuern der Strahlrastereinheit die übrigen gewünschten Probenpunkte gemessen, so daß die gesamte Probe 4 mit einer sehr hohen lateralen Auflösung vermessen wird.

5
10
15
20
25

Patentansprüche

1. Verfahren zum optischen Anregen eines Energiezustandes einer Probe in einem Probenpunkt mit hoher Ortsauflösung, bei dem das Anregungslicht einer Punktlichtquelle auf den zu messenden Probenpunkt fokussiert wird und dort den Energiezustand anregt, dadurch gekennzeichnet, daß der Energiezustand der Probe (4) in dem Probenpunkt (3) durch Zusammenwirken von wenigstens zwei in dem Anregungslicht enthaltenen Lichtanteilen angeregt wird, die sich durch wenigstens eine Lichteigenschaft voneinander unterscheiden, und daß die Lichtstrahlachsen der Lichtanteile derart gegeneinander versetzt werden, daß die fokalen Intensitätsverteilungen der Lichtanteile im Probenpunkt (3) in ihren Hauptmaxima überlappend, lateral gegeneinander verschoben werden.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß eine Lichteigenschaft, in der sich die Lichtanteile des Anregungslichtes voneinander unterscheiden, die Wellenlänge ist.
3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß der Unterschied in den Wellenlängen (L_1, L_2) der Lichtanteile wenigstens 1 nm beträgt.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß eine Lichteigenschaft, in der sich die Lichtanteile des Anregungslichtes voneinander unterscheiden, die Polarisation ist.
5. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Lichtanteile orthogonal oder nahezu orthogonal zueinander polarisiert sind.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß wenigstens der Lichteil des Anregungslichtes mit der einen Lichteigenschaft aus einem Mittenbereich des Anregungslichtstrahles herausgefiltert wird, bevor das Anregungslicht auf die Probe (3) fokussiert wird.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß zwei in der Lichteigenschaft verschiedene Lichtanteile des Anregungslichtes aus dem Mittenbereich des Anre-

25
30
35
40
45
50
55
60
65

gungslichtstrahles herausgefiltert werden, bevor das Anregungslicht auf die Probe (3) fokussiert wird.

8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß das von der Probe (4) in dem Probenpunkt (3) aufgrund der Anregung emittierte Emissionslicht aus dem Anregungslicht abgetrennt und in einem Detektor (6) nachgewiesen wird.

9. Vorrichtung zum optischen Anregen eines Energiezustandes einer Probe in einem Probenpunkt mit hoher Ortsauflösung, mit einer Punktlichtquelle und mit einem Objektiv, das das von der Punktlichtquelle kommende Anregungslicht zum Anregen des Energiezustandes auf den zu messenden Probenpunkt einer im Fokalbereich des Objektives anordbaren Probe fokussiert, dadurch gekennzeichnet, daß das Anregungslicht der Punktlichtquelle (1) wenigstens zwei Lichtanteile umfaßt, die sich durch wenigstens eine Lichteigenschaft voneinander unterscheiden und die dazu geeignet sind, durch gemeinsames Wirken den Energiezustand der Probe (3) anzuregen, und daß die Strahlachsen der Lichtanteile derart gegeneinander versetzt angeordnet sind, daß die fokalen Intensitätsverteilungen der Lichtanteile im Probenpunkt (3) in ihren Hauptmaxima überlappend, lateral gegeneinander verschoben sind.

10. Vorrichtung nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß ein Versetzungselement zum Versetzen der Strahlachsen der Lichtanteile vorgesehen ist.

11. Vorrichtung nach Anspruch 9 oder 10, dadurch gekennzeichnet, daß zwischen der Punktlichtquelle (1) und dem Objektiv (2) ein Filterelement (14) angeordnet ist, welches einen für wenigstens den Lichtanteil des Anregungslichtes mit der einen Lichteigenschaft undurchlässigen Mittenbereich (15) und einen für die Lichtanteile des Anregungslichtes durchlässigen Außenbereich (16) aufweist.

12. Vorrichtung nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß der Mittenbereich (15) des Filterelements (14) für zwei in der Lichteigenschaft verschiedene Lichtanteile des Anregungslichtes undurchlässig ist.

13. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 9 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß ein Separationselement (5) zum Abtrennen des von der Probe (4) abgestrahlten Emissionslichtes von dem Anregungslicht und ein Detektor (6) zum Nachweis des Emissionslichtes vorgesehen ist.

14. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 11 bis 13, dadurch gekennzeichnet, daß das Filterelement (14) am Ort oder in der Nähe der Eintrittspupille des Objektives (2) angeordnet ist.

15. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 11 bis 13 dadurch gekennzeichnet, daß das Filterelement (14) am Ort oder in der Nähe einer zu der Eintrittspupille des Objektives (2) optisch konjugierten Ebene angeordnet ist.

16. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 11 bis 15, dadurch gekennzeichnet, daß der Mittenbereich (15) des Filterelements (14) die Form einer Kreisscheibe hat, an welche sich der Außenbereich (16) anschließt.

17. Vorrichtung nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß das Filterelement (14) derart angeordnet ist, daß die Strahlachse der Teilstrahlen

- des Anregungslichtes etwa durch den Mittelpunkt der Kreisscheibe verläuft und die Kreisscheibe unter einem Winkel, der etwas kleiner als 90° ist, schneidet.
18. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 11 bis 17, dadurch gekennzeichnet, daß der Mittenbereich (15) durch eine auf das Filterelement (14) aufgebrachte dielektrische Schicht oder durch ein Farbglas optischer Güte gebildet ist. 5
19. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 11 bis 18, dadurch gekennzeichnet, daß der Mittenbereich (15) und der Außenbereich (16) des Filterelements (14) für das von der Probe (4) abgestrahlte Emissionslicht durchlässig sind. 10
20. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 9 bis 19, dadurch gekennzeichnet, daß die Punktlichtquelle (1) mindestens zwei Laser (7, 8) umfaßt, die Licht unterschiedlicher Wellenlängen (L_1, L_2) und/oder unterschiedlicher Polarisation (P_1, P_2) als Teilstrahlen emittieren. 15
21. Vorrichtung nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, daß die Punktlichtquelle (1) ein Verbindungselement (9) zum Zusammenführen der Teilstrahlen der Laser (7, 8) aufweist. 20
22. Vorrichtung nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, daß das Verbindungselement (9) ein dichroitischer Spiegel ist. 25
23. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 20 bis 22, dadurch gekennzeichnet, daß zwischen dem Verbindungselement (9) und jedem Laser (7, 8) jeweils ein Blendenelement (10, 11) und ein Fokussierungselement (12, 13) zum Fokussieren des jeweiligen Lichtstrahles der Lichtanteile auf das entsprechende Blendenelement (10, 11) vorgesehen sind. 30
24. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 9 bis 19, dadurch gekennzeichnet, daß die Punktlichtquelle (1) einen Laser (7) umfaßt, wobei hinter dem Laser (7) ein Strahlteiler zum Aufspalten des Anregungslichtstrahles in zwei Teilstrahlen und ein Verbindungselement (9) zum Vereinigen der Teilstrahlen vorgesehen ist. 35
25. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 20 bis 24, dadurch gekennzeichnet, daß polarisationsoptische Elemente vorgesehen sind, die die Teilstrahlen zueinander in ihrer Polarisation orthogonalisieren. 40
26. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 20 bis 25, dadurch gekennzeichnet, daß wenigstens ein gepulster Laser (7, 8) verwendet wird.
27. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 9 bis 26, dadurch gekennzeichnet, daß das Separationselement (5) ein dichroitischer Spiegel ist. 50
29. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 9 bis 28 dadurch gekennzeichnet, daß das Separationselement (5) eine Kombination von Farbfiltern und di-elektrischen Filtern enthält.
28. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 9 bis 26, dadurch gekennzeichnet, daß das Separationselement (5) mindestens einen Farbfilter aufweist.
29. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 9 bis 28 dadurch gekennzeichnet, daß das Separationselement (5) eine Kombination von Farbfiltern und di-elektrischen Filtern enthält. 60
30. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 9 bis 29, dadurch gekennzeichnet, daß der Detektor (6) in kurzer Entfernung hinter der Probe (4) angeordnet ist. 65
31. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 9 bis 29,

- dadurch gekennzeichnet, daß der Detektor (6) ein Punkt detektor ist.
32. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 9 bis 31, dadurch gekennzeichnet, daß vor dem Detektor (6) ein Fokussierungselement angeordnet ist, welches das Emissionslicht in den Detektor (6) fokussiert.
33. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 9 bis 32, dadurch gekennzeichnet, daß zwischen der Lichtquelle (1) und dem Objektiv (4) eine Strahlraster einrichtung (18) zum gesteuerten Abrastern der Probe (4) mit dem Anregungslicht vorgesehen ist.
34. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 9 bis 33, dadurch gekennzeichnet, daß die Probe (4) auf einem Positioniertisch (21) angeordnet ist, der geeignet ist, eine mechanische Rasterbewegung zumindest in Richtung der optischen Achse durchzuführen.
35. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 9 bis 34, dadurch gekennzeichnet, daß die Punktlichtquelle (1) derart ausgebildet ist, daß sie gepulstes Anregungslicht emittiert, wobei eine der Lichtanteile, der erste, dazu geeignet ist, einen Zwischenenergiezustand der Probe (4) anzuregen, ein anderer, der zweite, der Lichtanteile dazu geeignet ist, von dem Zwischenenergiezustand aus, den Energiezustand der Probe (4) anzuregen und wobei die Lichteigenschaft, in der sich die Lichtanteile unterscheiden, der Zeitpunkt des Verweilens des jeweiligen Lichtpulses an dem Probenpunkt (3) ist.
36. Vorrichtung nach Anspruch 35, dadurch gekennzeichnet, daß die Lichtquelle (1) einen gepulsten Laser (7), einen ersten Strahlteiler zum Aufspalten des von dem Laser (7) kommenden Anregungslicht in den ersten und in den zweiten Lichtanteil und einen zweiten Strahlteiler zum Vereinigen der beiden Lichtanteile umfaßt, wobei in dem Strahlengang des zweiten Lichtanteiles eine Verzögerungsvorrichtung (25, 26) zum Verzögern der Lichtpulse des zweiten Lichtanteiles, der zweiten Lichtpulse, vorgesehen ist.
37. Vorrichtung nach Anspruch 36, dadurch gekennzeichnet, daß die Verzögerungseinrichtung zwei Spiegel (25, 26) umfaßt.
38. Vorrichtung nach Anspruch 37, dadurch gekennzeichnet, daß die Spiegel (25, 26) gleichzeitig als das Versetzungsselement zum Versetzen der Strahlachsen der Lichtanteile dienen.
39. Vorrichtung nach Anspruch 37 oder 38, dadurch gekennzeichnet, daß die Verzögerungseinrichtung derart ausgebildet ist, daß die Zeitverzögerung zwischen dem Lichtpuls des ersten Lichtanteiles, dem ersten Lichtpuls, und dem zweiten Lichtpuls weniger als 1 ns, vorzugsweise etwa 0,1 ns oder weniger, beziehungsweise etwa 30 mm oder weniger im optischen Wegunterschied beträgt.
40. Verfahren nach einem der Ansprüche 36 bis 39, dadurch gekennzeichnet, daß die Lichtquelle (1) kurze Pulse, vorzugsweise Pulse, die kürzer als 0,1 ns sind, emittiert.
41. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 36 bis 40, dadurch gekennzeichnet, daß in dem Lichtweg des jeweiligen Lichtanteiles Elemente zur Intensitätsregulierung (27, 28) des Lichtanteiles vorgesehen sind.
42. Vorrichtung nach Anspruch 35 oder 36, dadurch gekennzeichnet, daß hinter dem Laser (7) eine nicht lineare optische Einheit (22) zur Veränderung der Lichtwellenlänge vorgesehen ist.

43. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß die Punktlichtquelle (1) gepulstes Anregungslicht emittiert, daß die Anregung des Energiezustandes der Probe (4) derart erfolgt, daß ein erster Lichtpuls eines ersten Lichtanteiles einen Zwischenenergiezustand der Probe (4) anregt, von welchem aus die Anregung in den Energiezustand der Probe (4) mit dem zweiten Lichtpuls des zweiten Lichtanteiles erfolgt, und daß eine Lichteigenschaft, in der sich die Lichtanteile unterscheiden, der Zeitpunkt des Verweilens des jeweiligen Lichtpulses an dem Probenpunkt (3) ist.

44. Verfahren nach Anspruch 43, dadurch gekennzeichnet, daß der Unterschied zwischen dem ersten Zeitpunkt des Verweilens des ersten Lichtpulses und dem zweiten Zeitpunkt des Verweilens des zweiten Lichtpulses an dem Probenpunkt (3) kleiner als die Lebensdauer des Zwischenzustandes ist und vorzugsweise ein Zehntel der Lebensdauer des Zwischenzustandes beträgt.

45. Verfahren nach Anspruch 44, dadurch gekennzeichnet, daß der Unterschied zwischen dem ersten und dem zweiten Zeitpunkt so gewählt ist, daß der erste Lichtpuls zu dem zweiten Zeitpunkt bereits die Probe (4) wieder verlassen hat.

46. Verfahren nach einem der Ansprüche 43 bis 45, dadurch gekennzeichnet, daß der Unterschied zwischen dem ersten und dem zweiten Zeitpunkt 1 ns, vorzugsweise 0,1 ns oder weniger, beträgt.

47. Verfahren nach einem der Ansprüche 43 bis 46, dadurch gekennzeichnet, daß die Lichtpulse zeitlich steil sind, eine zeitliche Länge von etwa einem Zehntel der Lebensdauer des Zwischenzustandes, vorzugsweise 0,1 nsec oder weniger, haben.

20

25

30

35

Hierzu 3 Seite(n) Zeichnungen

40

45

50

55

60

65

- Leerseite -

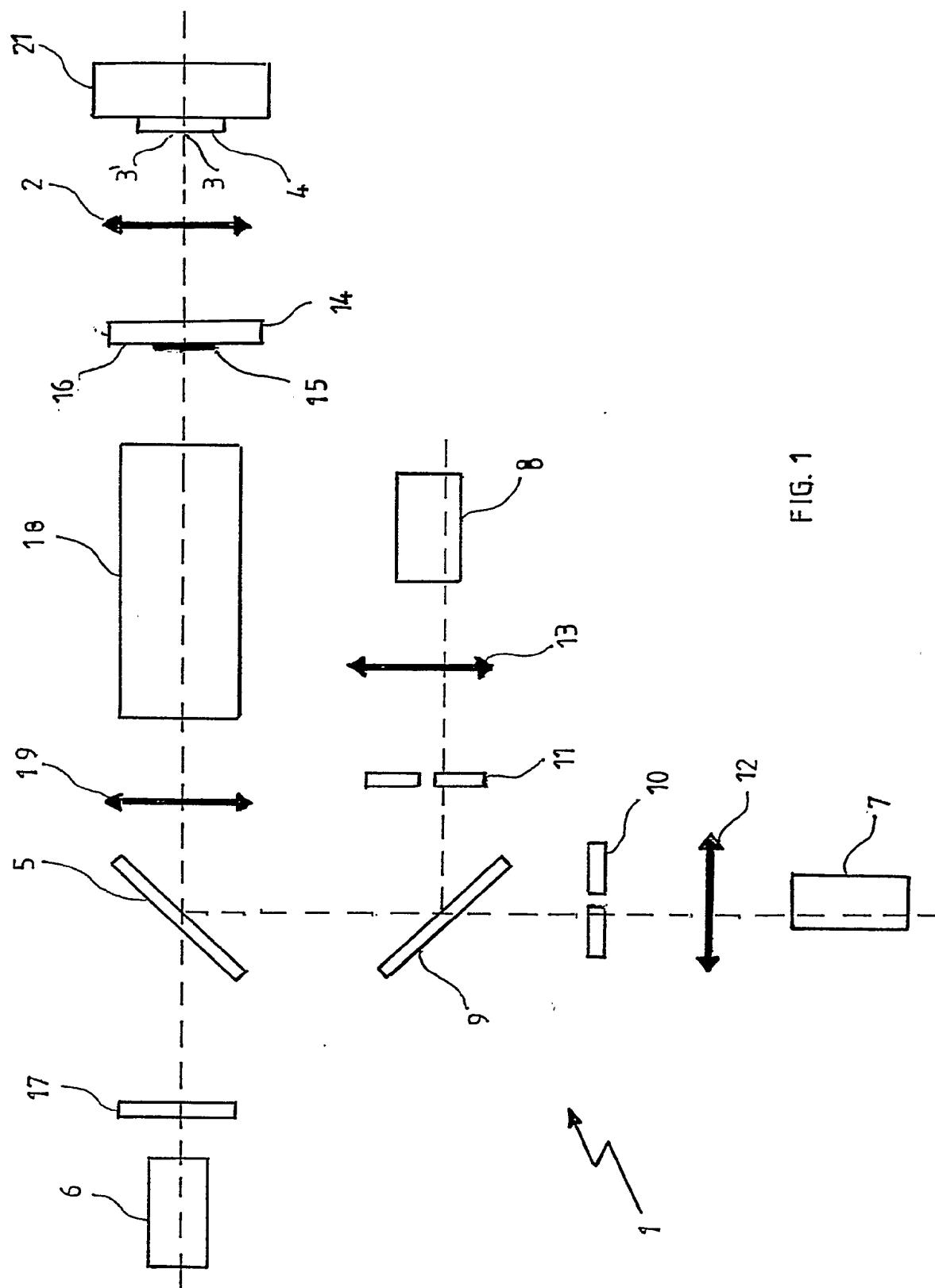


FIG. 1

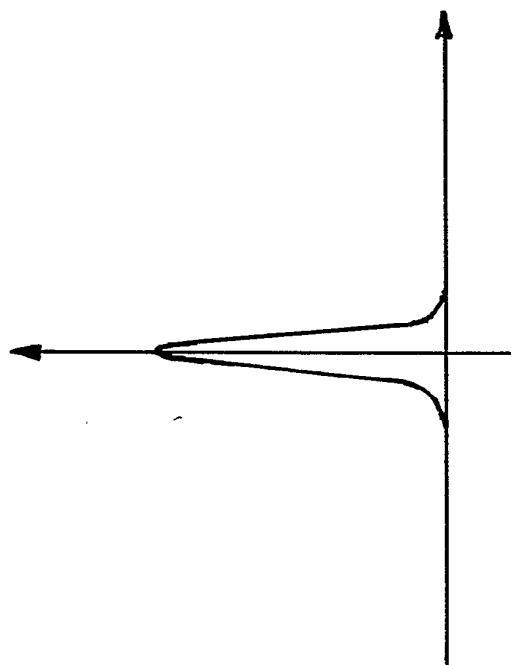


FIG. 3

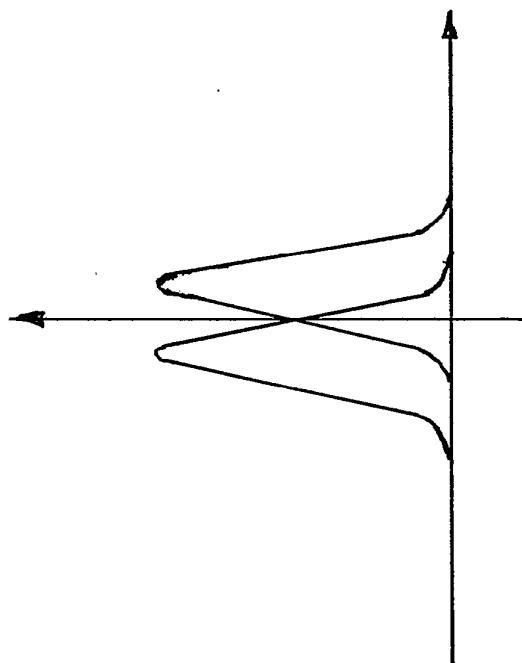


FIG. 2

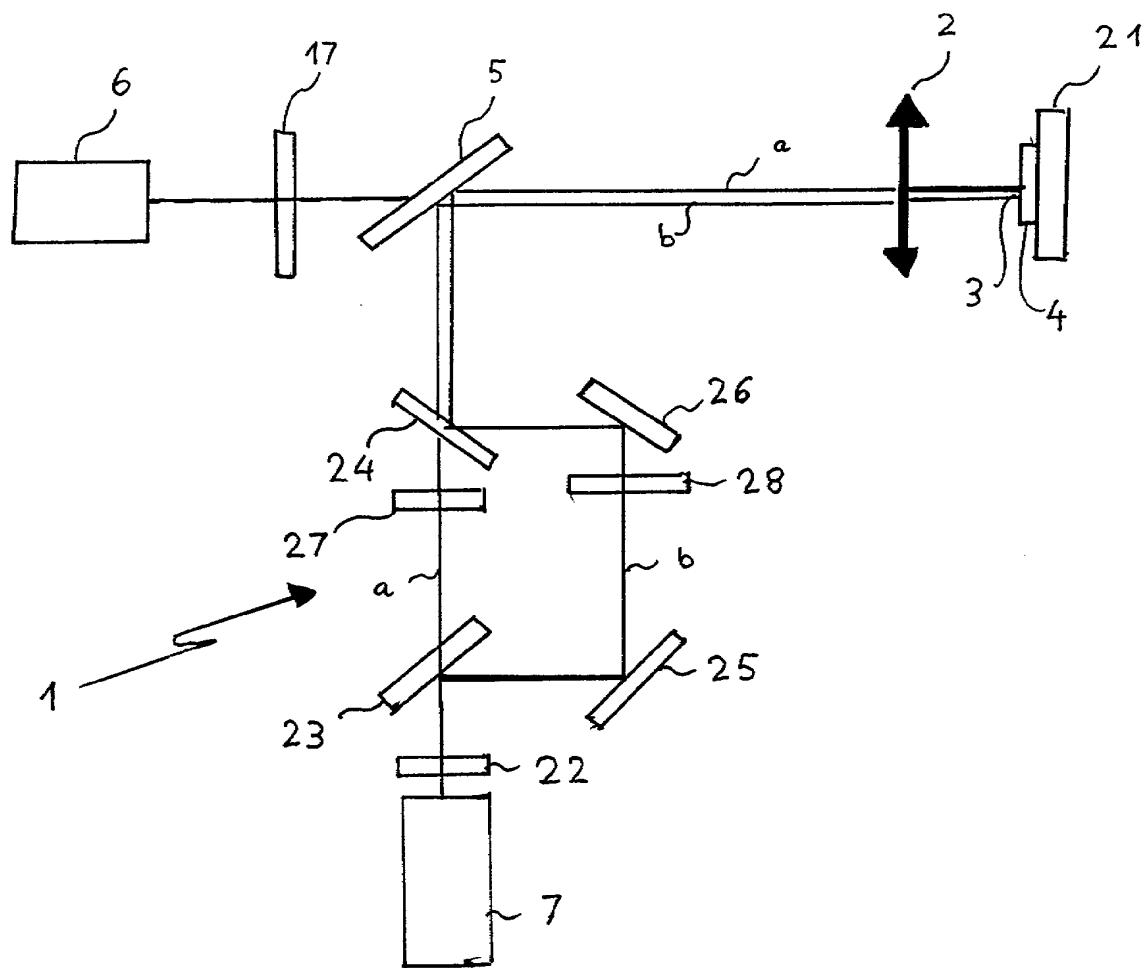


FIG. 4